



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10117799 A**(43) Date of publication of application: **12.05.98**

(51) Int. Cl.

**C12S 1/02**  
**C10G 32/00**  
**// C07D333/76**(21) Application number: **09056975**(22) Date of filing: **25.02.97**(30) Priority: **29.08.96 JP 08247098**(71) Applicant: **COSMO SOGO**  
**KENKYUSHO:KKCOSMO OIL CO**  
**LTD**(72) Inventor: **WARIISHI HIROYUKI**  
**TANAKA HIROO**  
**NISHIKAWA SEIJI**  
**HOTTA YASUSHI****(54) REDUCTION IN AMOUNT OF  
SULFUR-CONTAINING HYDROCARBON BY  
USING MICROORGANISM**

(57) Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To reduce the amount of a sulfur-containing hydrocarbon from petroleum, by bringing a sulfur-containing hydrocarbon such as dibenzothiophene into contact with a culture solution of a fungus belonging to the genus *Coriolus*, capable of converting the sulfur-containing hydrocarbon to a substance higher in hydrophilic nature.

**SOLUTION:** At least one sulfur-containing hydrocarbon such as dibenzothiophene, monomethyl benzothiophene or methyl benzothiophene is brought into contact with a culture solution, a suspension of the cultured fungus or a solution after removal of the cell in the culture solution of the fungus [e.g. *Coriolus versicolor*] belonging to the genus *Coriolus*, capable of converting at least one of the sulfur-containing hydrocarbons to a substance higher in hydrophilic nature to efficiently reduce the amount of the sulfur-containing hydrocarbon from petroleum such as gas oil or kerosene.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-117799

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月12日

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
C 1 2 S 1/02  
C 1 0 G 32/00  
// C 0 7 D 333/76

識別記号

F I  
C 1 2 S 1/02  
C 1 0 G 32/00  
C 0 7 D 333/76

A

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平9-56975

(22) 出願日 平成9年(1997) 2月25日

(31) 優先権主張番号 特願平8-247098

(32) 優先日 平8(1996) 8月29日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000130189

株式会社コスモ総合研究所  
東京都港区芝浦1丁目1番1号

(71) 出願人 000105567

コスモ石油株式会社  
東京都港区芝浦1丁目1番1号

(72) 発明者 割石 博之

福岡県福岡市東区香椎6-13-33

(72) 発明者 田中 浩雄

福岡県福岡市早良区西新2-21-33

(74) 代理人 弁理士 坂口 昇造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 含硫炭化水素の量を微生物を用いて減少させる方法

(57) 【要約】

【課題】 含硫炭化水素、特に石油類中に含有される含硫炭化水素の量を減少させる方法の提供。

【解決手段】 ジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種の含硫炭化水素をコリオラス属に属し、該少なくとも1種の含硫炭化水素をより親水性の高い物質に変換せしめる能力を有する微生物の培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液と接触させることを特徴とする、該含硫炭化水素の量を減少させる方法、およびジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種の含硫炭化水素を含有する石油類をコリオラス属に属し、該少なくとも1種の含硫炭化水素をより親水性の高い物質に変換せしめる能力を有する微生物の培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液と接触させることを特徴とする、該石油類中の含硫化合物量を減少させる方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種の含硫炭化水素をコリオラス属に属し、該少なくとも1種の含硫炭化水素をより親水性の高い物質に変換せしめる能力を有する微生物の培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液と接触させることを特徴とする、該含硫炭化水素の量を減少させる方法。

【請求項2】 ジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種の含硫炭化水素を含有する石油類をコリオラス属に属し、該少なくとも1種の含硫炭化水素をより親水性の高い物質に変換せしめる能力を有する微生物の培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液と接触させることを特徴とする、該石油類中の含硫化合物量を減少させる方法。

【請求項3】 微生物がカワラタケ (*Coriolus versicolor*) である請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】 培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液が、それぞれ、窒素源をN換算2.4mM未満に制限した条件下で該微生物を培養することによって得られる培養液、または該培養液から培養菌懸濁液もしくは培養液菌体除去液である請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 含硫炭化水素がモノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種であって、該接触によって該含硫炭化水素をより親水性の高い物質に変換せしめ、もって該培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液に移行させる請求項1～4のいずれかに記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、ジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェン、ジメチルジベンゾチオフェン等の含硫炭化水素を微生物を用いて効率的に減少させる方法、およびかかる含硫炭化水素を含有する石油類、例えば軽油や灯油から含硫化合物を微生物を用いて効率的に減少させる方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 原油には、1～5%程度の硫黄が、炭化水素と結合した状態で含まれている。原動機やボイラーやストーブの燃料に用いるためには、硫黄の含有率を低減させることが望ましい。ところが、工業的に用いられている水素化脱硫法では、ジメチルジベンゾチオフェン等のアルキル置換ジベンゾチオフェンに対する活性が極端に低いことが問題であった。また、この方法では、反応温度が非常に高く分解のために必要なエネルギーが高いことも問題であった。このような問題を解決するために、ジベンゾチオ

フェン、モノメチルジベンゾチオフェン、ジメチルジベンゾチオフェン等の含硫炭化水素を分解することのできる、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属に属する微生物を用いる方法が提案されている (PETROTECH 1995 Vol. 18 No. 1 p19～25、石油学会中部大会 1995)。微生物を利用する方法は、常温での反応であり、分解に対するエネルギーコストの低減が可能となる。水素化脱硫法では分解されにくいモノメチルジベンゾチオフェン、ジメチルジベンゾチオフェン等のアルキル置換ジベンゾチオフェンに対する分解活性が高い菌株が切望されている。

## 【0003】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、かかる課題を解決すべく研究を重ねた結果、カワラタケ等のコリオラス属に属する微生物が、ジベンゾチオフェン、およびモノメチルジベンゾチオフェン、ジメチルジベンゾチオフェン等のアルキル置換ジベンゾチオフェンに対する高い分解活性を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、

1. ジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種の含硫炭化水素をコリオラス属に属し、該少なくとも1種の含硫炭化水素をより親水性の高い物質に変換せしめる能力を有する微生物の培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液と接触させることを特徴とする、該含硫炭化水素の量を減少させる方法、および
2. ジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種の含硫炭化水素を含有する石油類をコリオラス属に属し、該少なくとも1種の含硫炭化水素をより親水性の高い物質に変換せしめる能力を有する微生物の培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液と接触させることを特徴とする、該石油類中の含硫化合物量を減少させる方法に関する。

【0004】 上記発明において、微生物としてはカワラタケ (*Coriolus versicolor*) であることが好ましく、また、上記の培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液が窒素源をN換算2.4mM未満に制限した条件下で該微生物を培養することによって得られる培養液、または該培養液からの培養菌懸濁液もしくは培養液菌体除去液であることが含硫炭化水素の減少速度を高めるために好ましい。さらに含硫炭化水素がモノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種である場合には、かかる含硫炭化水素の量または石油類中の含硫化合物の量をさらに減少させることができる。

【0005】 なお、本願は先の出願 (特願平8-247098、出願日：平成8年8月29日) に基づく優先権を主張してなされた出願で、先の出願日と本願の出願日との間で「平成8年度 日本生物工学会大会 講演要旨

集」(大会:平成8年10月2~4日)に先の出願の内容の一部が開示された(1038 担子菌を用いたジベンゾチオフェン及びその誘導体の分解)。その後、本発明者らはさらに研究を重ねて、先の出願に開示した上記含硫炭化水素の親水性化合物への変換機構とは別に、モノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンのメチル基のヒドロキシメチル基さらにはグリコシドメチル基への変換による親水性化合物への変換機構が存在することを見出した。本願はかかる背景に基づいて成されたものである。

#### 【0006】

【発明の実施の形態】本発明において使用する微生物としては、コリオラス(*Coriolus*)属に属し、該少なくとも1種の含硫炭化水素をより親水性の高い物質に変換せしめる能力を有する微生物を用いることができる。かかる微生物の具体例としてはカワラタケを挙げることができる。用いる培地としては炭素源、窒素源等を程よく含有する培地であれば良く、炭素源としてはグルコース、デンプン、スクロース、麦芽糖等を用いることができ、窒素源としては、酵母抽出物、ポリペプトン、カザミノ酸、N2アミン、各種アンモニウム塩、各種硝酸塩、尿素等を用いることができる。適宜ビタミン、金属塩を添加することができる。かかる培地として具体的には馬鈴薯デンプン培地等を挙げることができる。

【0007】コリオラス属に属し、上記能力を有する微生物を用いて、ジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェン、ジメチルジベンゾチオフェン等の量を減少させる場合には、窒素源をN換算2.4mM未満、好ましくは2~5mMに制限した条件下で該微生物を培養することが、減少速度を高めるために好ましい。培養条件については特に制限はないが、培養は通常温度10~40℃、好ましくは20~35℃、pH2~9、好ましくは4~8で10~300時間、好ましくは24~100時間行うのが適当である。

【0008】かくして得られる培養液、該培養液を濾過、遠心分離等に付して菌体を分離し、これを水に懸濁した液(=培養菌懸濁液)、または該培養液を濾過、遠心分離等に付して菌体を除去して得られる濾液もしくは上清液(=培養液菌体除去液)をついでジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種の含硫炭化水素またはかかる含硫炭化水素を含有する石油類と接触させる。上記含硫炭化水素と培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液とを接触させる方法は特に制限されないが、かかる接触は、例えば、上記含硫炭化水素をエタノール、メタノール、プロパノール等のアルコールまたはアセトン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、デカン、ドデカン、テトラデカン、ヘキサデカン等の有機溶媒に溶解するかまたは水に分散させ、ついでこの溶液または分散液を培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除

去液に分散させることにより行うことができる。この分散は、拡散、攪拌または容器の振とうにより行うことができる。

【0009】また上記含硫炭化水素を含有する石油類としては、軽油、灯油等が挙げられる。石油類と培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液との接触は、特に制限されないが、例えば単に両者を攪拌、容器の振とう等により混合することにより行うことができる。上記いずれの発明の実施態様においても、該含硫炭化水素と培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液との使用割合については、特に制限はないが、該含硫炭化水素は培養液に対して10~1000mg/L、好ましくは30~500mg/Lの量的割合で使用するのが適当であり、培養菌懸濁液に対しては湿菌体に対する割合として1~200mg/g、好ましくは2~100mg/gの量的割合で使用するのが適当であり、培養液菌体除去液に対しては10~1000mg/L、好ましくは30~500mg/Lの量的割合で使用するのが適当である。

【0010】上述の分散または混合法により、通常温度10~40℃、好ましくは20~35℃、pH2~9、好ましくは4~8で上記含硫炭化水素が目的とする量まで実質的に減少するに十分な時間、例えば10~300時間、好ましくは24~100時間、培養液または懸濁液中の微生物または培養液中に放出された菌体外酵素と該含硫炭化水素とを接触させることで、該含硫炭化水素は、より親水性の高い化合物に変換される。すなわち、該含硫炭化水素中のスルフェニル基(—S—)がスルフィニル基(—SO—)さらにはスルホニル基(—SO<sub>2</sub>—)に、またモノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンのメチル基がヒドロキシメチル基さらには還元糖の存在下にグリコシドメチル基に変換され、かかる変換により生じる含硫化合物は水層中に移行する。また該接触により一部は分解されたり、微生物に摂取されることも考えられる。このようにして該含硫炭化水素の量が減少する。なお、上記グリコシドメチル基への変換において、添加する糖類の少なくとも一部が本発明で使用する微生物(の酵素)の作用によりキシロースに変換され、これがヒドロキシメチル基に作用してキシロシドメチル基を形成する場合があり、このキシロシドメチル基の形成は使用微生物がカワラタケである場合、通常、見られる。例えば、グルコースでカワラタケの培養を行った場合、配糖化されたもののかなりの部分がキシロースであることが確認されている。

【0011】また、該含硫炭化水素を含有する石油類を用いる場合には、かかる石油類と培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液との上記温度、pH、時間条件下での接触により、同様な機構により石油類中の含硫化合物量を減少させることができる。ここで石油類中の含硫化合物とは接触前では該含硫炭化水素をはじめとする該石油類中に存在する含硫化合物を指称し、接触後では

該石油類中に残存する該含硫炭化水素をはじめとする含硫化合物および接触により新たに生じた含硫化合物で該石油類中に留まっているものを指称する。

【0012】上述した培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液とジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種の含硫炭化水素またはかかる含硫炭化水素を含有する石油類との接触に際し、含硫炭化水素がモノメチルジベンゾチオフェンおよびジメチルジベンゾチオフェンから選ばれる少なくとも1種の含硫炭化水素である場合には、かかる含硫炭化水素は上記2つの変換機構により親水性が大幅に増した含硫化合物に変換され、変換物の大部分が水層に移行するので含硫炭化水素の量または石油類中の含硫化合物の量をさらに減少させることができる。上記の場合に、培養終了後の培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液中の糖類の含量(=濃度)を0.01~200g/Lに調整することが好ましい。糖類の含量が0.01g/L未満の場合にはメチル基のヒドロキシメチル基を介してのグリコシドメチル基への変換が十分に進行せずしたがって上記含硫炭化水素の量または石油類中の含硫化合物の量の減少が十分でない場合が生ずる可能性がある。糖類の含量が200g/Lを超えても含硫炭化水素の量または石油類中の含硫化合物の量の減少の程度がさらに増すことはなく不経済である。なお、上記観点から培養液、培養菌懸濁液または培養液菌体除去液中の糖類の含量は0.1~100g/Lであることがより好ましく、0.5~50g/Lであることがさらに好ましく、1~10g/Lであることがもっとも好ましい。

【0013】上記の糖類含量は培養時に添加する炭素源によつて達成される場合が多いが、達成されない場合には培養終了後の適当な時期に糖類を添加すれば良い。上記糖類としては単糖類、二糖類、多糖類のいずれでも良いが、還元糖、例えば単糖類、マルトース、ラクトース等が好ましく、グルコース、キシロース、フルクトース、マンノースが特に好ましい。これらの糖類は本発明で使用する微生物による資化性にかかわらず、培養前に添加しても良く、資化されるものは炭素源を兼ねて添加しても良い。石油類中の含硫化合物の量を減少させる場合には、上記接触後油層を水層から分離することにより含硫化合物の量の減少した石油類を得ることができる。

【0014】

【実施例】次に、実施例をもって本発明を具体的に説明する。当該分野の研究常識に照らし、本発明が以下に示す実施例で用いられる実験条件の末節に限定されないの

は明らかである。実施例中、培地組成中の%はg/dLを表わす。また、実施例中、高速液体クロマトグラフィーにより各成分を分析した旨記載されているが、高速液体クロマトグラフィーは各成分を定量する際に用いたもので、構造を同定するにはさらにGC-MSあるいはNMR等を使用した。

【0015】実施例

(1) 90mm平板寒天培地(グルコース1%、寒天1.5%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)に7日間生育させたカワラタケ(IFO-30340)菌糸を50mLの滅菌水と共にホモジナイズし、菌糸懸濁液2mLを液体培地(グルコース1%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)10mLに添加した。30℃で4日間静置培養し、菌体がマット状になったところへアセトンに溶解した50mMの基質ジベンゾチオフェンを100μL添加し、100rpmで往復振とう培養した。添加後の基質の減少量を高速液体クロマトグラフィー(ODS-11カラム、20%アセトニトリル/0.05%リン酸水溶液→100%アセトニトリル、240nm)で測定した。高速液体クロマトグラフィーのサンプルは、20μLのサンプル培養液に等量のアセトンを加えたものを用いた。基質の消失速度を表3に示す。

【0016】(2) 加える基質を4-メチルジベンゾチオフェンとする以外は、実施例1と同様に操作した。

(3) 加える基質を4,6-ジメチルジベンゾチオフェンとする以外は、実施例1と同様に操作した。

(4) 加える基質をジベンゾチオフェン-5-オキシドとする以外は、実施例1と同様に操作した。

(5) 液体培地に加える酒石酸アンモニウムを1.2mMとする以外は、実施例1と同様に操作した。

(6) 液体培地に加える酒石酸アンモニウムを1.2mMとする以外は、実施例2と同様に操作した。

(7) 液体培地に加える酒石酸アンモニウムを1.2mMとする以外は、実施例3と同様に操作した。

(8) 液体培地に加える酒石酸アンモニウムを1.2mMとする以外は、実施例4と同様に操作した。参考に、ロドコッカス属微生物および水素化脱硫触媒によるジベンゾチオフェン、4-メチルジベンゾチオフェンおよび4,6-ジメチルジベンゾチオフェンの分解相対速度を表4に示す。

【0017】

【表1】

表 1 Salt液Aの組成

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20g
MgSO <sub>4</sub>	5.0g
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	1.3g
チアミン塩酸塩	10mg
Salt液B	100ml
／L H <sub>2</sub> O	

【0018】

【表2】

表 2 表1中のSalt液Bの組成

C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	1.5g	MnSO <sub>4</sub>	0.7g
CoSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.18g	FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.1g
ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.18g	NaCl	1.0g
CuSO <sub>4</sub> ・5H <sub>2</sub> O	10mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	12mg
AlK(SO <sub>4</sub> )・12H <sub>2</sub> O	18mg	CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.1g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10mg	MgSO <sub>4</sub>	0.5g
／L H <sub>2</sub> O			

【0019】

【表3】

表 3 含硫炭化水素の消失速度

	含硫炭化水素消失速度 ( $\mu$ mol/L/hour)	相対速度 (実施例5を100%とする)	
実施例1	0.3	15	ジベンゾチオフェン
実施例2	0.3	15	4-メチルジベンゾチオフェン
実施例3	0.1	5	4,6-ジメチルジベンゾチオフェン
実施例4	0.6	35	ジベンゾチオフェン-5-オキサイド
実施例5	2.1	100	ジベンゾチオフェン
実施例6	4.3	205	4-メチルジベンゾチオフェン
実施例7	1.0	50	4,6-ジメチルジベンゾチオフェン
実施例8	4.0	195	ジベンゾチオフェン-5-オキサイド

【0020】

【表4】

表 4 参考例

	Rhodococcus属微生物による 分解相対速度 (%) (1)	水素化脱硫触媒による 分解相対速度 (%) (2)
ジベンゾチオフェン	100	100
4-メチルジベンゾチオフェン	108	16
4,6-ジメチルジベンゾチオフェン	34	10

出典: (1) 石油学会 中部大会 1995 (2) PETROTECH 1995 VOL.18 NO.1 p19-25

【0021】表3から明らかなように、本発明方法によってジベンゾチオフェン、モノメチルジベンゾチオフェン、ジメチルジベンゾチオフェン等の含硫炭化水素の量を減少させることができることが分かる。また、窒素源をN換算2.4mM未満に制限した条件下で該微生物を培養することにより分解力が向上することが分る。表3と表4の比較から明らかなように、モノメチルジベンゾチオフェン、ジメチルジベンゾチオフェン等のアルキル置換ジベンゾチオフェン類の分解のために本発明方法が特

に有効であることが分る。

【0022】(9) 実施例1の高速液体クロマトグラフィーのピークの中にジベンゾチオフェンと異なる保持時間の新ピークが観察された。高速液体クロマトグラフィーでの保持時間、GC/MS分析でのフラグメンテーションパターンから該新ピークはジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドであることが分った。

(10) 実施例2の高速液体クロマトグラフィーのピークの中に4-メチルジベンゾチオフェンと異なる保持時

間の新ピークが観察された。高速液体クロマトグラフィーでの保持時間、GC/MS分析でのフラグメンテーションパターンから該新ピークは4-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドであることが分った。

【0023】(11) 90mm平板寒天培地(グルコース1%、寒天1.5%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)に7日間生育させたカワラタケ(IFO-30340)菌糸を50mLの滅菌水と共にホモジナイズし、菌糸懸濁液2mLを液体培地(グルコース1%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)10mLに添加した。30℃で4日間静置培養し、菌体がマット状になったところへ、1.0mgの基質4-メチルジベンゾチオフェンを溶解したヘキサデカン0.5mLを添加し、添加後100時間往復振とう培養し、その後、静置して層分離させた。有機層を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ4-メチルジベンゾチオフェンは0.6mgに減少していた。また、有機層には、0.1mgの4-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドが存在し、水層には0.05mgの4-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドが存在していた。水層には4-メチルジベンゾチオフェンは存在しなかった。

【0024】(12) 90mm平板寒天培地(グルコース1%、寒天1.5%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)に7日間生育させたカワラタケ(IFO-30340)菌糸を50mLの滅菌水と共にホモジナイズし、菌糸懸濁液2mLを液体培地(グルコース1%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)10mLに添加した。30℃で4日間静置培養し、菌体がマット状になったところへ、1.5mgの基質ジベンゾチオフェンを溶解したドデカン0.5mLを添加し、添加後100時間往復振とう培養し、その後、静置して層分離させた。有機層を高速液体クロマトグラフィーで分析したところジベンゾチオフェンは1.0mgに減少していた。また、有機層には、0.05mgのジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドが存在し、水層には0.1mgのジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドが存在していた。水層にはジベンゾチオフェンは存在しなかった。

【0025】実施例9、10、11および12から明らかなようにジベンゾチオフェン類は、本発明方法により硫黄原子への酸素付加を受けていることが分かる。また実施例11および12から明らかなように本発明方法によれば、ヘキサデカンやドデカン中の含硫化合物量が減少していることが分かる。実施例11、12におけるヘキサデカン、ドデカンは軽油や灯油の主成分であり、本

発明の効果の具体的な評価に際して、軽油や灯油での効果を代替するものといえる。また、検出された4-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドあるいはジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドの物質量は、4-メチルジベンゾチオフェンあるいはジベンゾチオフェンの消失量を完全に説明しないが、ジベンゾチオフェン類の明確な消失は、さらなる分解の進行を示している。

【0026】(13) 90mm平板寒天培地(グルコース1%、寒天1.5%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)に7日間生育させたカワラタケ(IFO-30340)菌糸を50mLの滅菌水と共にホモジナイズし、菌糸懸濁液2mLを液体培地(グルコース1%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)10mLに添加した。30℃で4日間静置培養し、マット状になった菌体をピンセットで取り除き、残った培養液にアセトンに溶解させた50mMの基質4-メチルジベンゾチオフェンを20μL添加し、添加後の基質の減少量を実施例1と同じ方法で測定した。60時間後、30%の4-メチルジベンゾチオフェンが消失していた。実施例13から明らかなように、菌体外に放出された酵素類によって含硫炭化水素の量が減少することが分る。

【0027】(14) 90mm平板寒天培地(グルコース1%、寒天1.5%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)に7日間生育させたカワラタケ(IFO-30340)菌糸を50mLの滅菌水と共にホモジナイズし、菌糸懸濁液2mLを液体培地(グルコース1%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)10mLに添加した。30℃で4日間静置培養し、マット状になった菌体をピンセットで取り出し、液体培地(グルコース1%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)10mLに再懸濁した。これにアセトンに溶解させた50mMの基質4-メチルジベンゾチオフェンを20μL添加し、添加後の基質の減少量を実施例1と同じ方法で測定した。100時間後、30%の4-メチルジベンゾチオフェンが消失していた。実施例14から明らかなように、培養菌懸濁液によって含硫炭化水素量が減少することが分る。

【0028】(15) 90mm平板寒天培地(グルコース1%、寒天1.5%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)に7日間生育させたカワラタケ(IFO-30340)菌糸を50mLの滅菌水と共にホモジナイズし、菌糸懸濁液2mLを液体培地(グルコース1%、Salt液A(表1)100mL/L、酢酸

ナトリウム緩衝液5.0mM、酒石酸アンモニウム1.2mM)10mLに添加した。30℃で4日間静置培養し、菌体がマット状になったところへ、0.5mgの基質4-メチルジベンゾチオフェンを溶解したヘキサデカン1mLを添加し、添加後150時間往復振とう培養し、その後、静置して層分離させた。有機層を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ4-メチルジベンゾチオフェンは0.05mgに減少していた。また、水層には、0.01mgの4-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、0.1mgの4-メチロールジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、および0.4mgの、4-グルコシドもしくは4-キシロシド-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドまたはその両者が存在し、有機層には0.01mgの4-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドが存在した。有機層には4-メチロールジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、および4-グルコシドおよび4-キシロシド-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドは存在しなかった。なお、上記静置培養後の培養液中のグルコースおよびキシロースの合計量は約0.3%であった。

【0029】(16)加える有機溶媒をドデカンとする以外は実施例15と同様に操作した。有機層を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ4-メチルジベンゾチオフェンは0.05mgに減少していた。また、水層には、0.01mgの4-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、0.15mgの4-メチロールジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、および0.3mgの、4-グルコシドもしくは4-キシロシド-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドまたはその両者が存在し、有機層には0.01mgの4-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドが存在した。有機層には4-メチロールジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、および4-グルコシドおよび4-キシロシド-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドは存在しなかった。

【0030】(17)加える基質を0.5mgの4,6-ジメチルジベンゾチオフェンとする以外は実施例15と同様に操作した。有機層を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ4,6-ジメチルジベンゾチオフェ

ンは0.2mgに減少していた。また、水層には、0.05mgの4,6-ジメチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、0.1mgの4-メチロール-6-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、および0.1mgの、4-グルコシドもしくは4-キシロシド-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドまたはその両者が存在し、有機層には0.05mgの4,6-ジメチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドが存在した。有機層には4-メチロール-6-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、および4-グルコシドおよび4-キシロシド-メチル-6-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドは存在しなかった。

【0031】(18)加える基質を0.5mgの4-メチロールジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドとする以外は実施例15と同様に操作した。有機層を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ4-メチロールジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドは存在しなかった。また、水層には、0.1mgの4-メチロールジベンゾチオフェン-5-ジオキサイド、および0.6mgの、4-グルコシドもしくは4-キシロシド-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドまたはその両者が存在した。

(19)微生物を培養する培地の糖類をグルコースに代えて1%のキシロースとする以外は実施例18と同様に操作した。有機層を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ4-メチロールジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドは存在しなかった。また、水層には、0.1mgの4-メチロールジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドおよび0.5mgの4-キシロシド-メチルジベンゾチオフェン-5-ジオキサイドが存在した。

【0032】実施例15~19から明らかなように、メチル置換ジベンゾチオフェン類は、本発明方法により硫黄原子への酸素付加およびメチル基への水酸化、さらに水酸基への糖類の付加を受けており、これにより生じた含硫化合物はその水溶性により水層に取り除かれる。

【0033】

【発明の効果】本発明によれば含硫炭化水素、特に燃料油等の石油類中に含有される含硫化合物の量を効率的に減少させることができる。

フロントページの続き

(72)発明者 西川 誠司  
埼玉県幸手市権現堂1134-2 株式会社コスモ総合研究所研究開発センター内

(72)発明者 堀田 康司  
埼玉県幸手市権現堂1134-2 株式会社コスモ総合研究所研究開発センター内